

学校编码: 10384
学号: 21720081152631

分类号 Q75 密级 公开
UDC 578

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

厦门地区手足口病的流行监测

Epidemiological Surveillance of Head Foot and Mouth
Disease in Xiamen

李 淼

指导教师姓名: 史维国 教授
专 业 名 称: 生物化学与分子生物学
论文提交日期: 2011 年 5 月
论文答辩时间: 2011 年 6 月
学位授予日期: 2011 年 6 月

答辩委员会主席: 滕伯刚

评阅人: 赵忠芳 孙慧

2011 年 5 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（夏宁邵）课题（组）的研究成果，获得（夏宁邵）课题（组）经费或实验室的资助，在（国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- (✓) 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“✓”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

近年来,手足口病发病率在我国正逐年上升,重症病例和死亡人数也相应增多,严重危害广大少年儿童的健康。手足口病目前尚无有效的疫苗和治疗方法,因此监测手足口病的流行扩散趋势显得尤为重要。

本研究首先建立了一套 HFMD nRT-PCR 检测系统,包括总 EV、EV71、CA16 三套检测引物。总 EV 扩增区段位于 5' UTR 区,具有一定变异性,可通过测序确定病毒的进化地位;EV71、CA16 扩增区段位于 VP1 区,可部分代替传统的 VP1 全长测序。对该方法进行的性能研究,证明了该方法具有较好的灵敏度,特异性和可重复性,适用于 HFMD 流行病学监测。

本研究调查了厦门地区 2009 年 HFMD 的流行情况。结果显示,2009 年厦门地区手足口病发病率约为 1.19‰,男女比例为 1.65:1。年龄最小者 0.1 岁,最大者 38 岁,其中 0.5-4 岁儿童占 88.9%。地区分布方面,厦门岛内送检样本占 62.87%,岛外送检样本占 37.13%。主要流行时间为 4-8 月。

本研究连续监测了厦门地区 2008 年第四季度至 2011 年第一季度 HFMD 病原谱变化情况。结果显示,厦门地区主要流行的 HFMD 病原包括 CA16、EV71、CA6 三种病毒。其中 CA16 是 2009 年的主要流行株,2010 年之后所占比例下降;EV71 的比例在 2010 年达到高峰,之后下降;CA6 在 2011 年成为主要流行株。此外,在研究中发现一株 EV71-B5 亚型病毒,这也是中国大陆地区首次发现的 EV71-B5 病毒。

对 HFMD 相关的主要肠道病毒进行分子进化分析,结果显示除上文提到的 EV71 B5 亚型外,厦门地区流行的 EV71 均可归入 C4 亚型中的 a 亚型。EV71 在 2008 年之后的理论感染数量明显升高。厦门地区的 CA16 属于 B1 亚型。CA16 B 亚型的理论感染数量自 1995 年之后呈缓慢增长的趋势。厦门地区 CA6 包括两个分支:一支与芬兰毒株进化关系较近,一支与日本毒株进化关系较近,揭示了该地区

CA6 的两种可能起源。厦门地区 CA10 仅包括一个分支，与山东株 GQ214173 关系较近，可能最初是由此株传播而来。厦门地区 CB3 仅包括一个分支，且与中国大陆地区报道的流行株在同一分支上，说明厦门地区 CB3 主要从内陆传播而来。

关键词： 厦门；手足口病；流行病学

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

During the recent years, the incidence of hand, foot and mouth disease(HFMD) in China is increasing, Severe cases and death in a corresponding increase, which seriously harms the health of children. There is currently no vaccine and effective treatment for HFMD, so the epidemiological investigation is particularly important.

In this study, an HFMD nRT-PCR detection sysytem is established, including three sets of primers: whole EV, EV71 and CA16. Amplified segment is both conserved and variable, which allows the evolutionary position to be determined by sequencing. This can partly replace the traditional VP1 full-length sequencing. This system has a good correlation compared with commerical regent. Study on the properties of this method proved that it has good sensitivity, specificity and reproducibility, suitable for the epidemiological surveillance of HFMD.

In this study, we investigated 5097 ambulatory cases and 75 severe cases, dating from 2008 to 2011. It shows that the incidence rate of HFMD is 1.19‰in Xiamen, 2009. Gender ratio is 1.65: 1. Aging from 0.1 to 38 years old, the patients are majorly 1-4 years old children. As about the regional distribution, Xiamen island takes 62.87%, while outside Xiamen island takes 37.13%. The major epidemic time is from April to August. Severe cases mainly appeared in May and June, when HFMD was pandemic. The main symptoms are fever, rash, and convulsions.

On the pathogen spectrum monitoring of Xiamen HFMD, we discovered CA16 was the primary enterovirus in Xiamen, 2009. EV71 was secondary. However, in 2010, EV71 changed to be the primary, and CA16 was secondary. The rate of CA6 was greatly incereased in the date from May to November. In 2011, CA6 became the primary enterovirus, and EV71 was secondary. suspected recombination and co-infection was also observed, in which the amount of EV71 and CA16 is much greater

than other combinations. This could be associated with the fact that these two viruses were the major epidemic strains. Besides, an EV71 B5 subtype strain was discovered, which was the first discovery of EV71 B5 subtype in China mainland.

Molecular evolution analysis showed that the epidemic EV71 in Xiamen can be classified as subtype a in subtype C4. It can be furtherly divided into three branches: L1, L2 and L3. The ratio of L1 and L2 was decreasing by time, while the ratio of L3 was increasing. It can be anticipated that L1 and L2 branches will gradually become demise, and L3 will become the majority in Xiamen. Evolutionary rate of EV71 C4 subtype was 5.58×10^{-3} per site per year. Evolutionary divergence time was about 1992. Theoretical infection quantity notability increased in 2008. It can be predicted that the theoretical infection quantity would have a downtrend after 2010. The epidemic CA16 in Xiamen can be classified as subtype B1. It can be furtherly divided into two branches: B1a and B1b. It can be predicted that the two branches will have coexistence in future. Evolutionary rate of CA16 B subtype was 9.507×10^{-3} per site per year. Evolutionary divergence time was about 1972. Theoretical infection quantity was slowly increased from 1995, but no outbreak. The epidemic CA6 in Xiamen can be divided into two branches, one close to Finland strain and the other close to Japan strain. The two branches competed with each other, there is currently no sign of any branch demise. The epidemic CA10 in Xiamen has a close relationship with the Shandong strain GQ214173, but not close to other Shandong strains, which indicated this strain might be the one firstly transmitted to Xiamen. The epidemic CB3 in Xiamen has only one branch, which was the same branch reported from other places in China, indicating it might be transmitted from China inland.

Keywords: Xiamen; HFMD; Epidemiology

目 录

摘 要	I
英文摘要	III
目 录	V
英文目录	IX
缩略词	XIII
第一章 前言	1
1.1 手足口病的病原	1
1.1.1 肠道病毒的分类	1
1.1.2 EV71 的结构与基因组	6
1.1.3 EV71 的生活史	7
1.2 手足口病的临床症状与致病机理	9
1.2.1 普通病例	9
1.2.2 重症病例	10
1.2.3 致病机理	11
1.2.4 预防和治疗	12
1.3 手足口病的流行病学	14
1.3.1 历史	14
1.3.2 流行特点	15
1.3.3 分子流行病学	17
1.4 手足口病的实验室检测	21
1.4.1 病原学检测	21

1.4.2 免疫学检测	23
1.4.3 核酸检测	26
1.5 本文研究的目的和意义	28
第二章 材料与方法	29
2.1 材料	29
2.1.1 仪器	29
2.1.2 试剂	29
2.1.3 菌株和质粒	30
2.1.4 细胞株和病毒株	30
2.1.5 参考序列	31
2.2 方法	34
2.2.1 缓冲液配制	34
2.2.2 常规实验操作	36
2.2.3 PCR 检测方法	39
2.2.4 分子进化分析方法	44
第三章 结果与分析	45
3.1 HFMD 监测系统	45
3.1.1 厦门 CDC HFMD 监测系统介绍	45
3.1.2 本实验室标本处理流程	45
3.1.3 nRT-PCR 检测系统的建立	46
3.2 厦门地区 HFMD 病例统计分析	57
3.2.1 年龄分布	57
3.2.2 地区分布	57
3.2.3 时间分布	59
3.2.4 重症病例分析	59
3.3 厦门地区 HFMD 病原谱监测	62
3.3.1 病毒检出情况	62

3.3.2	病原分布	62
3.3.3	病原随时间变化情况	62
3.3.4	疑似重组与重叠感染现象	62
3.3.5	厦门地区 EV71-B5 亚型的发现	65
3.4	EV71 分子进化分析	68
3.4.1	基本参数	68
3.4.2	系统进化树	68
3.4.3	进化起源探索	69
3.4.4	理论感染数量	70
3.5	CA16 分子进化分析	73
3.5.1	基本参数	73
3.5.2	系统进化树	73
3.5.3	进化起源探索	76
3.5.4	理论感染数量	76
3.6	其他 HFMD 病原分子进化分析	78
3.6.1	CA6 分子进化分析	78
3.6.2	CA10 分子进化分析	79
3.6.3	CB3 分子进化分析	79
第四章	讨论	83
4.1	HFMD 病原检测的方法学讨论	83
4.1.1	全部采样与方便采样的比较	83
4.1.2	病毒分离与核酸检测的比较	84
4.1.3	qRT-PCR 与 nRT-PCR 的比较	84
4.2	厦门地区手足口病流行的主要特征	84
4.3	肠道病毒分子进化探讨	85
第五章	小结与展望	87
	参考文献	89

致 谢

101

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract	III
Contents	IX
Abbreviation	XIII
Chapter 1 Preface	1
1.1 Pathogen of hand, foot and mouth disease	1
1.1.1 Classification of enterovirus	1
1.1.2 Structure and genome of enterovirus 71	6
1.1.3 Life Cycle of EV71	7
1.2 Clinical symptoms and pathogenesis of HFMD	9
1.2.1 General case	9
1.2.2 Severe case	10
1.2.3 Pathogenesis of HFMD	11
1.2.4 Prevention and treatment	12
1.3 The epidemiology of HFMD	14
1.3.1 History	14
1.3.2 Epidemic characteristics	15
1.3.3 Molecular epidemiology of EV71	17
1.4 Laboratory assay of HFMD	21
1.4.1 Pathogen detection	21
1.4.2 Immunoassay	23
1.4.3 Nucleic acid assay	26
1.5 The purpose and significance of this study	28

Chapter 2	Materials and Methods	29
2.1	Materials	29
2.1.1	Instruments	29
2.1.2	Reagents	29
2.1.3	Strains and plasmids	30
2.1.4	Cell lines and virus strains	30
2.1.5	Reference sequence	31
2.2	Methods	34
2.2.1	Buffer preparation	34
2.2.2	General experimental operation	36
2.2.3	PCR assay	39
2.2.4	Molecular evolutionary analysis	44
Chapter 3	Results and Analysis	45
3.1	HFMD monitoring system	45
3.1.1	Introduction of Xiamen CDC HFMD monitoring system	45
3.1.2	Specimen processing procedure in the laboratory	45
3.1.3	Establishment of nRT-PCR detection system	46
3.2	Statistics of HFMD cases in Xiamen	57
3.2.1	Age distribution	57
3.2.2	Regional distribution	57
3.2.3	Time distribution	59
3.2.4	Analysis on severe cases	59
3.3	Xiamen HFMD pathogen spectrum monitoring	62
3.3.1	Detection Rate of enterovirus	62
3.3.2	Pathogen distribution	62
3.3.3	Pathogenic changes over time	62
3.3.4	Suspected recombination and coinfection	62

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库